

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
4 août 2005 (04.08.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/071087 A1

- (51) Classification Internationale des brevets⁷ :
C12N 15/74, C12R 1/01
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/000049
- (22) Date de dépôt International :
10 janvier 2005 (10.01.2005)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
0400191 9 janvier 2004 (09.01.2004) FR
- (71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (IRD) [FR/FR]; 213, Rue La Fayette,
F-75480 Paris Cédex 10 (FR). COMMISSARIAT A
L'ENERGIE ATOMIQUE (CEA) [FR/FR]; 31-33 Rue
de la Fédération, F-75752 Paris Cédex 15 (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : FAR-
DOUX, Joël [FR/FR]; Le Perou n°21, F-34380 Saint
Martin De Londres (FR). GIRAUD, Eric [FR/FR]; 228,
Chemin des Loriots, F-34170 Castelnau Le Lez (FR).
HANNIBAL, Laure [FR/FR]; 728, Rue de Fontcarrade
Bât. 1, F-34070 Montpellier (FR). VERMEGLIO, André
[FR/FR]; 390, Chemin du Ventoux, F-84120 Pertuis (FR).
- (74) Mandataires : PEAUCELLE, Chantal etc.; CABINET
ARMENGAUD AINE, 3, Avenue Bugeaud, F-75116 Paris
(FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues.
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

WO 2005/071087 A1

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING CAROTENOIDS AND BACTERIA USED THEREFOR

(54) Titre : PROCEDE DE PRODUCTION DE CAROTENOIDES ET BACTERIES MISES EN OEUVRE

(57) Abstract: The invention concerns a method for synthesizing non-photosynthetic carotenoids using photosynthetic bacteria while producing at least one photosynthetic carotenoid of which one of the synthesis intermediates is lycopene. The inventive method is characterized in that it comprises a number of steps: the deletion and insertion of specific genes; the culturing of bacteria, and; the extraction of carotenoids. The invention also concerns the bacteria or mutants used in the aforementioned method.

(57) Abrégé : La présente invention est relative à un procédé de synthèse de caroténoïdes non photosynthétiques mettant en œuvre des bactéries photosynthétiques produisant au moins un caroténoïde photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le lycopène caractérisé en ce qu'il comporte plusieurs étapes parmi lesquelles : délétion et insertion de gènes spécifiques, mise en culture des bactéries modifiées et extraction des caroténoïdes. L'invention couvre également les bactéries ou mutants mis en œuvre dans le procédé.

**"Procédé de production de caroténoïdes
et bactéries mises en œuvre."**

La présente invention est relative à un procédé de
synthèse de caroténoïdes, en particulier, de caroténoïdes non
photosynthétiques, par des bactéries photosynthétiques, en
particulier, par *Rhodospseudomonas palustris* et aux bactéries
5 mises en œuvre dans le procédé.

Plus de 600 caroténoïdes ont été identifiés dans la
nature. Ils sont répandus chez de très nombreux organismes
vivants mais ne sont synthétisés de novo que par un nombre
restreint d'organismes (plantes, bactéries, levures). Certains
10 de ces caroténoïdes (lycopène, β -carotène, canthaxanthine,
astaxanthine) sont utilisés de façon intensive et très diverse
dans l'industrie agro-alimentaire pour leur propriété
colorante (rouge pour le lycopène, jaune pour le β -carotène,
orangé pour la canthaxanthine, rose-orange pour
15 l'astaxanthine). On retrouve en particulier l'utilisation de
l'astaxanthine et de la canthaxanthine en aquaculture pour
l'élevage des saumons et des truites afin de renforcer la
couleur rose- orange de la chair du poisson et en aviculture
pour accentuer la couleur jaune-orange des œufs qui, dans les
20 2 cas, est appréciée par les consommateurs.

De plus, de par leurs propriétés antioxydantes et leur
rôle de photo protection, ils sont utilisés dans l'industrie
pharmaceutique et cosmétique pour l'obtention entre autre de
crème solaire protectrice et de produits bronzants. Il existe
25 déjà dans certains pays toute une série de produits dérivés de
la canthaxanthine, du β -carotène et du lycopène,
commercialisés dans les instituts de beauté et de body-
building. Ces caroténoïdes ont également été décrits comme
possédant des propriétés anti-cancéreuses. En effet, ces
30 molécules peuvent réduire l'activité des radicaux libres,
supposés contribuer à la formation de cellules cancéreuses.

La synthèse actuelle de ces caroténoïdes est principalement réalisée par voie chimique. Etant donné la tendance du consommateur à préférer les produits ayant une origine naturelle, il existe donc un marché potentiel pour des caroténoïdes de provenance végétale ou microbienne. De plus, il apparaît que les configurations isomériques de certains caroténoïdes produits par voie chimique ne correspondent pas aux principaux isomères retrouvés dans la nature. Cette différence peut s'avérer très importante car elle est susceptible d'entraîner une bio-assimilation supérieure des caroténoïdes d'origine naturelle par rapport à ceux issus de la synthèse chimique.

La voie de biosynthèse de ces 4 principaux caroténoïdes (lycopène, β -carotène, astaxanthine, canthaxanthine) est présentée dans la figure 1. Le lycopène synthétisé grâce à l'action successive des enzymes CrtE, CrtB et CrtI est un intermédiaire commun aux 3 autres caroténoïdes. La synthèse du β -carotène peut être ainsi réalisée à partir du lycopène grâce à l'enzyme CrtY, celle de la canthaxanthine grâce aux enzymes CrtY et CrtW et celle de l'astaxanthine grâce aux enzymes CrtY, CrtW et CrtZ.

Plusieurs bactéries ont été décrites pour leur capacité à produire l'un de ces 4 caroténoïdes (*Brevibacterium*, *Agrobacterium auriantiacum*, *Erwinia uredovora*, *Erwinia herbicola*, *Myxococcus xanthus*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Bradyrhizobium* ...).

En particulier, des travaux antérieurs des inventeurs, qui ont fait l'objet d'un dépôt aux Etats-Unis sous le numéro US 60/297,247, ont porté sur la souche *Bradyrhizobium* ORS278. Ces travaux ont démontré l'existence d'un cluster de gènes (crtE, crtY, crtI, crtB, crtW) intervenant dans la voie de biosynthèse de la canthaxanthine. Ces différents gènes, une fois introduit chez *E. coli*, se sont avérés fonctionnel.

À l'exception de *Bradyrhizobium*, qui synthétise une faible quantité de photosystème, ces bactéries sont généralement des bactéries non-photosynthétiques qui accumulent de faibles quantités de produits et qui ont bien souvent un taux de
5 croissance limité. La nature de la souche productrice constitue donc un obstacle majeur pour assurer une productivité suffisamment intéressante pour un industriel.

Par ailleurs, ces bactéries ne produisent en général qu'un seul de ces 4 caroténoïdes. Ceci implique pour un industriel
10 voulant produire un panel de ces 4 principaux caroténoïdes d'utiliser différentes souches bactériennes qui vont chacune exiger des conditions bien particulières de culture et de production. D'autre part, la culture de différentes souches sur un même site peut entraîner de nombreuses difficultés
15 logistiques liées aux problèmes de contamination.

Enfin, les caroténoïdes sont des composés hydrophobes qui ne peuvent être stockés dans la cellule que dans un environnement lipophilique, généralement des compartiments membranaires. Les bactéries produisant des caroténoïdes
20 d'intérêt industriel possèdent en général une membrane interne faiblement développée. Cette propriété, qui limite donc la quantité de caroténoïdes que l'on peut accumuler dans ces cellules, constitue l'un des problèmes majeurs pour une utilisation industrielle de ces bactéries.

Les travaux des inventeurs les ont donc amenés à
25 rechercher une bactérie pouvant synthétiser suivant les conditions de cultures et/ou suivant les gènes caroténoïdes introduits dans celle-ci, l'ensemble de ces 4 principaux caroténoïdes et ceci en palliant les défauts des autres
30 bactéries.

Les bactéries photosynthétiques présentent des avantages majeurs : une vitesse de croissance très rapide et une très forte capacité photosynthétique. Les caroténoïdes chez les bactéries photosynthétiques sont associés aux photosystèmes et

jouent un rôle essentiel dans son fonctionnement. La forte activité photosynthétique est accompagnée de la synthèse en grande quantité de caroténoïdes photosynthétiques associée à la mise en place de membranes intracytoplasmiques en abondance
5 constituant une zone de stockage importante pour les caroténoïdes.

Néanmoins, ces bactéries ne synthétisent en général qu'un seul pigment, la spirilloxanthine ou le sphéroïdène, qui ne présentent pas, à l'heure actuelle, d'intérêt industriel.

10 Afin d'obtenir un microorganisme producteur de lycopène, β -carotène, canthaxanthine ou astaxanthine, les inventeurs ont exploité le potentiel que présentent les bactéries photosynthétiques en détournant la voie de synthèse endogène du caroténoïde photosynthétique vers la synthèse de
15 caroténoïdes non photosynthétiques c'est à dire non associé au photosystème, chez ces bactéries: β -carotène, canthaxanthine ou astaxanthine.

La présente invention est donc relative à un procédé de synthèse de caroténoïdes non photosynthétiques choisis parmi
20 le β -carotène, la canthaxanthine ou l'astaxanthine mettant en œuvre des bactéries photosynthétiques produisant au moins un caroténoïde photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le lycopène, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- 25 i. Délétion, chez les bactéries, d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,
- ii. Insertion des gènes suivants :
- 30 - soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser est le β -carotène,
- soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le β -carotène,

- soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le β -carotène,
 - iii. Mise en culture desdites bactéries ainsi modifiées, et,
 - iv. Extraction du ou des caroténoïde(s) contenu(s) dans les
- 5 bactéries.

De manière surprenante, il a été constaté qu'une bactérie synthétisant un caroténoïde photosynthétique (c'est-à-dire impliqué dans la photosynthèse) restait photosynthétique lorsque la voie de synthèse endogène dudit caroténoïde était

10 détourné vers la synthèse de caroténoïdes non photosynthétiques.

En effet, la bactérie continue de synthétiser de manière résiduelle du lycopène, caroténoïde photosynthétique, qui permet à celle-ci de maintenir son activité de photosynthèse

15 en remplaçant dans le photosystème le caroténoïde photosynthétique synthétisé de manière endogène.

Les gènes à déléter au moins partiellement sont en général, les crtC, crtD et/ou crtF. De préférence, les gènes crtC et crtD seront au moins partiellement délétés. Ces gènes

20 sont en effet les premiers à être mis en œuvre dans la synthèse de la spirilloxanthine à partir du lycopène. (voir figure 1)

En outre, il peut également être nécessaire de déléter dans certaines bactéries le crtA. Ce sera le cas pour les

25 bactéries synthétisant du lycopène-2-one. (voir figure 1)

De préférence, les bactéries photosynthétiques sont les suivantes : *Rubrivivax gelatinosus*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodospirillum moliscianum*, *Rhodospirillum salinarum*, *Rhodospirillum mediosalinum*, *Rhodospirillum sodomense*,

30 *Rhodocista centenaria*, *Rhodospira trueperi*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodopseudomonas acidophila*, *Rhodopseudomonas julia*, *Rhodopseudomonas cryptolactis*, *Rhodomicrobium vanniellii*, *Rhodoplanes roseus*, *Rhodoplanes elegans*, *Rhodobium orientis*, *Rhodobium marinum* ...

Plus particulièrement, le procédé selon l'invention propose des conditions de culture assurant une production à un niveau satisfaisant de ces différents caroténoïdes. En particulier, il s'agit d'un procédé de synthèse de
5 canthaxanthine ou d'astaxanthine, caractérisé en ce que les conditions de la mise en culture des bactéries sont séquentielles et comportent les étapes suivantes :

- a. Mise en culture desdites bactéries ainsi modifiées dans un premier temps en anaérobiose sous
10 éclaircissement,
- b. Puis, dans un second temps en aérobiose ou en microaérobiose, à l'obscurité.

En effet, chez les bactéries photosynthétiques, les gènes photosynthétiques, incluant les gènes *crtE*, *crtB*, et *crtI* de
15 la voie de biosynthèse du lycopène sont sous le contrôle de l'oxygène et de la lumière. En particulier, chez certaines souches ces gènes ne s'expriment pas à l'obscurité et sont inhibés par la présence d'oxygène (> à 8%). Cette répression par l'oxygène résulte d'un facteur de transcription appelé
20 PpsR qui à forte pression partielle en oxygène se fixe sur les régions promotrices des gènes photosynthétiques, dont les gènes *crt*, empêchant ainsi leur transcription.

En revanche, l'absence de dioxygène est défavorable à la production de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine. En
25 effet, la réaction enzymatique catalysée par les enzymes *CrtW* (β -carotène kétolase) ou *CrtZ* (β -carotène hydroxylase) intervenant dans la voie de biosynthèse de ces 2 caroténoïdes nécessite de l'oxygène (voir Figure 1). Il est donc nécessaire pour permettre la synthèse de canthaxanthine et d'astaxanthine
30 de trouver un compromis au niveau des conditions de culture afin d'assurer d'une part la synthèse de l'intermédiaire lycopène et d'autre part sa transformation en canthaxanthine ou en astaxanthine.

Avantageusement, les étapes a et b des conditions de culture permettant d'obtenir préférentiellement de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine sont réitérées successivement. Une telle itération permet l'accumulation des caroténoïdes dans les cellules.

Alternativement, le procédé selon l'invention permet la production de β -carotène si l'on modifie les conditions de culture. Ces conditions photosynthétiques de mise en culture sont alors les suivantes :

- 10 a. Mise en culture desdites bactéries ainsi modifiées en anaérobiose sous éclairage.

En effet, le fonctionnement de l'enzyme CrtY (lycopène cyclase) qui permet la transformation de lycopène en β -carotène n'étant pas oxygène-dépendante, l'absence de l'étape
15 b des conditions de culture pour la canthaxanthine ou l'astaxanthine permet d'arrêter la synthèse au stade du β -carotène.

Une seule bactérie permet donc de synthétiser à la fois du lycopène et préférentiellement, soit du β -carotène, soit de la
20 canthaxanthine ou de l'astaxanthine selon les gènes introduits et les conditions de culture.

Alternativement, les conditions de culture permettant d'obtenir préférentiellement de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine peuvent être réalisées en conditions de
25 microaérobiose sous éclairage en une seule étape.

En condition de microaérobiose, le pourcentage de dioxygène est de préférence compris entre 1 et 10%, plus particulièrement, 3 à 8%, bornes incluses.

Afin de s'affranchir des limitations dues à la régulation
30 de la synthèse par le dioxygène, l'invention propose également un procédé de synthèse de caroténoïdes non photosynthétiques choisis parmi le β -carotène, la canthaxanthine ou l'astaxanthine, mettant en œuvre des bactéries photosynthétiques produisant au moins un caroténoïde

photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le lycopène, caractérisé en ce que le procédé comporte les étapes suivantes :

- i. Mise en œuvre de mutants de bactéries photosynthétiques dont la photosynthèse n'est plus réprimée par le dioxygène,
- ii. Délétion, chez les bactéries, d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,
- iii. Insertion des gènes suivants :
 - soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser est le β -carotène,
 - soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le β -carotène,
 - soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le β -carotène,
- iv. Mise en culture desdites bactéries ainsi modifiées en aérobiose ou microaérobiose afin de synthétiser de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine ou mise en culture en condition d'anaérobiose afin de synthétiser du β -carotène, et,
- v. Extraction du ou des caroténoïde(s) contenu(s) dans les bactéries.

Les mutants dont la photosynthèse n'est plus réprimée par le dioxygène sont obtenus en particulier par délétion du gène codant pour le facteur de transcription PpsR, ledit facteur réprimant l'expression de certains gènes crt à forte pression partielle en dioxygène.

Avantageusement, les bactéries mises en œuvre dans le procédé sont du genre *Rhodopseudomonas*, de préférence de l'espèce, *Rhodopseudomonas palustris*.

Certaines bactéries ne synthétisent pas de lycopène, mais un intermédiaire plus en amont dans la voie de synthèse des

caroténoïdes. Il est alors possible de modifier ces bactéries de manière à les faire synthétiser du lycopène.

Les bactéries photosynthétiques du procédé selon l'invention sont alors obtenues à partir de bactéries photosynthétiques produisant au moins un caroténoïde photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le phytoène, le phytofluène, le ζ -carotène ou le neurosporène, lesdites bactéries ayant subi éventuellement une délétion ou disruption du gène crtI endogène, suivie d'une insertion d'un gène crtI exogène codant pour une phytoène désaturase assurant 4 étapes successives de désaturation du phytoène.

Les bactéries sont préférentiellement : *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter veldkampii*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter azotoformans*, *Rhodobacter blasticus*, *Rhodovulum sulfidophilum*, *Rhodovulum adriaticum*, *Rhodovulum euryhalinum*, *Rhodovulum strictum* ...

Dans une telle hypothèse, les gènes à déléter sont identiques à ceux cités précédemment. En effet, les dérivés du sphéroïdène sont obtenus à partir du neurosporène (le crtI endogène code pour une phytoène désaturase assurant seulement 3 étapes successives de désaturation du phytoène). Les gènes codant pour les premières enzymes mises en œuvre par la suite sont le crtC, le crtD et/ou le CrtF. (voir figure 1)

En outre, il peut également être nécessaire de déléter dans certaines bactéries le crtA. Ce sera le cas pour les bactéries synthétisant du ζ -carotène-2-one ou du neurosporène-2-one. (voir figure 1)

De manière avantageuse, l'insertion des gènes crtY, crtZ et/ou crtW du procédé selon l'invention est réalisée dans la zone des gènes au moins partiellement délétés.

Alternativement, les gènes crtY, crtZ et/ou crtW peuvent également être insérés dans un plasmide.

L'invention couvre également les bactéries photosynthétiques produisant, de manière alternative ou

concomitante, au moins du lycopène, du β -carotène et de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine, caractérisées en ce que lesdites bactéries sont susceptibles d'être obtenues par le procédé selon l'invention.

5 En particulier, ces bactéries photosynthétiques synthétisant au moins un caroténoïde dont l'intermédiaire de synthèse est le lycopène, sont caractérisées en ce qu'elles comportent les mutations suivantes :

10 i. Délétion d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,

ii. Insertion des gènes suivants :

15 - soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser est le β -carotène,

- soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le β -carotène,

- soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le β -carotène.

20 Alternativement, il s'agit d'un mutant de bactéries photosynthétiques synthétisant au moins un caroténoïde dont l'intermédiaire de synthèse est le lycopène, dont la synthèse du photosystème n'est plus réprimée par le dioxygène, produisant de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine,
25 caractérisé en ce qu'il comporte les mutations suivantes:

i. Délétion d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,

30 ii. Insertion des gènes suivants :

- soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser est le β -carotène,

- soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le β -carotène,
- soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le β -carotène.

Ces bactéries ou mutants peuvent être obtenus à partir de bactéries ou de mutants produisant au moins un caroténoïde dont l'un des intermédiaires de synthèse est le phytoène, le phytofluène, le ζ -carotène ou le neurosporène, lesdites bactéries ou mutants ayant subi éventuellement une délétion ou disruption du gène crtI endogène, suivie d'une insertion d'un gène crtI exogène codant pour une phytoène désaturase assurant 4 étapes successives de désaturation du phytoène.

De manière surprenante, il a été constaté que ces bactéries ou mutants de bactéries photosynthétiques, bien qu'ayant leur voie de synthèse du caroténoïde photosynthétique endogène détournée vers la synthèse d'un caroténoïde non photosynthétique d'intérêt ont leur activité photosynthétique maintenue.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples avec références aux figures suivantes :

- la figure 1 représente le schéma de synthèse des différents caroténoïdes visés par l'invention,

- la figure 2 présente le schéma de synthèse de la stratégie de construction du plasmide pJQ200mp18/crtDC :: crtY :: crtW :: apha3

- la figure 3 présente le schéma de synthèse de la stratégie de construction du plasmide pJQ200mp18/crtDC :: crtY :: crtZ :: crtW :: apha3, et,

- la figure 4 est une analyse par HPLC des caroténoïdes synthétisés par la souche mutante *R. palustris*

CEA001ΔcrtDC ::crtY ::crtW sous différentes conditions de culture.

Exemple 1 : construction d'une souche mutante de
5 *Rhodopseudomonas palustris* produisant du lycopène

La séquence du cluster de gènes crt de *R. palustris* impliqué dans la synthèse de la spirilloxanthine est accessible sur Internet à l'adresse suivante <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Acc Number : BX572597).

10 Comme dans *Bradyrhizobium* ORS278, les gènes crtE, crtI, crtB, crtC, crtD, crtF sont présents et organisés en 3 opérons

La stratégie générale de construction de cette souche mutante va consister à disrupter les gènes crtD et crtC en y
15 insérant une cassette codant un gène de résistance à la kanamycine (gène apha3).

1^{ère} étape : isolement et clonage des gènes crtDC de *R. palustris*, :

20 Une région correspondant à une partie des gènes crtDC de *R. palustris* a été amplifiée à l'aide du couple d'amorces :

crtD.R.palu.XhoI.f : GAGCTCGAGTTCGCCGGCATCGGCCTGAACTTCTC
(SEQ ID N°1)

CrtC.R.palu.XhoI.r : CTGCTCGAGAGGAGTATTACGGACTGATCGAAC
25 (SEQ ID N°2)

Les amorces ont été conçues de façon à insérer un site de restriction XhoI de part et d'autre du produit de PCR.

Les amplifications sont réalisées avec une ADN polymérase haute fidélité commercialisée par Invitrogen® (Platinum Pfx
30 DNA Polymerase).

Les conditions d'amplification sont les suivantes: après une étape initiale de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 5 min, 35 cycles de PCR sont effectués (94°C pendant 15s puis 55°C pendant 30s puis 68°C pendant 3 min), suivis d'une étape

finale d'élongation (68°C pendant 7 min) au cours de laquelle
1 µl de Taq polymérase classique (GoTaq, Promega®) est rajouté
dans le tube de PCR afin d'insérer un résidu de déoxyadénosine
aux extrémités 3' des fragments d'amplification (cette étape
5 est indispensable pour permettre le clonage dans le vecteur
pGEM-T utilisé ultérieurement).

Le produit de PCR ainsi obtenu est cloné dans le vecteur
de clonage pGEM-T (commercialisé par la société Promega®)
suivant le protocole du fournisseur. Le plasmide obtenu est
10 nommé pGEM-T/crtDC.XhoI).

2^{ème} étape : Construction du plasmide pJQ200mp18/crtDC

La région correspondant aux gènes crtDC de *R. palustris*
est libérée par digestion XhoI du plasmide pGEM-T/crtDC.XhoI
15 puis ligaturée dans le vecteur suicide pJQ200mp18 linéarisé
par digestion SalI. Ce plasmide contient le gène suicide sacB
qui permet de sélectionner sur saccharose les clones pour
lesquels un événement de double « crossing over » a bien eu
lieu (Quandt, J. & Hynes, M. F. « Versatile suicide vectors
20 which allow direct selection for gene replacement in gram-
negative bacteria » ; Gene 127, 15-21, 1993).

3^{ème} étape: Construction du plasmide pJQ200mp18/crtDC : : aphA-3

25 Le gène aphA-3 codant une résistance à la kanamycine est
libéré du plasmide pUC4K commercialisé par la société
Amersham® par digestion avec l'enzyme SalI. Il est alors
inséré dans le plasmide pJQ200mp18/crtDC linéarisé par SalI.
Il est à noter que cette dernière digestion SalI entraîne une
30 délétion d'un fragment de 618pb correspondant à l'extrémité 5'
du gène crtD et l'extrémité 3' du gène crtC.

Le plasmide pJQ200mp18 /crtDC : :aphA-3 est enfin
transféré par électroporation dans la souche conjugative
Escherichia coli S17.1.

4ième étape : Construction d'une souche mutante de *R. palustris* contenant la cassette *aphA3* au niveau des gènes *crtD*, *crtC*.

5 Le plasmide précédent pJQ200mp18 /*crtDC* : *aphA-3* est délivré dans la souche sauvage de *R. palustris* (CEA001) par conjugaison avec la souche précédente *E. coli* S17.1 contenant la construction. Les clones conjuguants sont sélectionnés sur milieu Hutner (R. K. Clayton « Towards the isolation of a
10 photochemical recation center in *Rhodopseudomonas sphaeroides* » ; Biochim. Biophys. Acta 75 : 312-318, 1963) contenant de la kanamycine 150µg/ml et de la carbenicilline 50µg/ml. Les clones double recombinants sont sélectionnés après repiquage des clones conjuguant sur milieu Hutner
15 contenant du saccharose 5% et de la kanamycine (150µg/ml). Une vérification par PCR est effectuée sur plusieurs clones recombinants afin de s'assurer que l'insertion de la cassette *aphA3* au niveau des gènes *crtD* et *crtC* de *R. palustris*.

La production de lycopène en grande quantité a été
20 constatée chez les bactéries ainsi mutées. Par ailleurs, le caractère photosynthétique de la bactérie est conservé.

Exemple 2 : Construction d'une souche mutante de
Rhodopseudomonas palustris produisant du β -carotène ou de la
25 *canthaxanthine*

Schéma de construction

La stratégie de construction de cette souche mutante est résumée dans la figure 2.

Dans cette figure, les légendes des étapes sont les
30 suivantes :

1^{ère} étape : Amplification des gènes *crtY* et *crtW* de *Bradyrhizobium* ORS278, ainsi que des gènes *crtDC* de *R. palustris*. Clonage des produits de PCR dans le plasmide p-GEMT (Promega).

2^{ème} étape : Libération par *SalI* de la cassette *apha3* du plasmide puc4K commercialisé par Amersham. Insertion au niveau du site *XhoI* unique présent en aval de *crtW*.

3^{ème} étape : Libération des gènes *crtW* et *apha3* par *KpnI/EcoRI*. Insertion dans le plasmide pGEM-T/*crtY* linéarisé par les mêmes enzymes.

4^{ème} étape : Libération des gènes *crtY*, *crtW* et *apha3* par *BglIII/EcoRI*. Insertion dans le plasmide pGEM-T/*crtDC* linéarisé par les mêmes enzymes.

10 5^{ème} étape : Libération des gènes *crtDC*, *crtY*, *crtW* et *apha3* par *XbaI*. Insertion dans le plasmide pJQ200mp18 linéarisé par la même enzyme.

A. Stratégie de Construction

15 La stratégie globale pour construire une souche mutante de *R. palustris* produisant soit du β -carotène soit de la canthaxanthine a consisté à disrupter les gènes *crtD*, *crtC* de *R. palustris* en y insérant les gènes *crtY* et *crtW* de *Bradyrhizobium* ORS278 ainsi qu'un gène *aphA-3* codant pour une
20 résistance à la kanamycine.

Suivant les conditions d'oxygénation de la culture (voir exemple 3) l'enzyme *CrtW* transformant le β -carotène en canthaxanthine est fonctionnelle ou pas, ce qui conduit au choix à une accumulation de β -carotène ou de canthaxanthine.

25 1^{ère} étape : isolement et clonage des gènes *crtDC* de *R. palustris*, *crtY* et *crtW* de *Bradyrhizobium* ORS278 :

Une région correspondant à une partie des gènes *crtDC* de *R. palustris* a été amplifiée à l'aide du couple d'amorces :

30 *crtD.R.palu.XbaI.f* : GAGTCTAGATTCGCCGGCATCGGCCTGAACTTCTC
(SEQ ID N°3)

CrtC.R.palu.XbaI.r : CTGTCTAGAAGGAGTATTACGGACTGATCGAAC
(SEQ ID N°4)

Les amorces ont été conçues de façon à insérer un site de restriction *XbaI* de part et d'autre du produit de PCR.

Le gène *crtY* de *Bradyrhizobium* ORS278 a été amplifié à l'aide du couple d'amorces suivant:

5 *crtY.278.f* :

TGAGATCTGGAGGCTGTCGTCATGAGTCGAGATGCCGACGTCATCGTC (SEQ ID N°5)

crtY.278.r : GTTGAATTCCTGGTACCTCATGGGGTCTTGAAGGCGCTCGCCTCA
(SEQ ID N°6)

10 Les amorces ont été conçues de façon à insérer un site de fixation du ribosome RBS et un site de restriction *BglII* en 5' ainsi qu'un site de restriction *KpnI* et *EcoRI* en 3' du produit de PCR.

Le gène *crtW* de *Bradyrhizobium* ORS278 a été amplifié à l'aide du couple d'amorces suivant :

15 *crtW.ORS278.f* :

CGGTACCGGGAGCTTTGCCAATGCATGCAGCAACCGCCAAGGCTAC (SEQ ID N°7)

crtW.ORS278.r : GTGAATTCCATGCTCGAGCGGGTTTAGTCACGCCTTTCCAG
(SEQ ID N°8)

20 Les amorces ont été conçues de façon à insérer un site de fixation du ribosome RBS et un site de restriction *Kpn I* en 5' ainsi qu'un site de restriction *Xho I* et *EcoR I* en 3' du produit de PCR.

Les amplifications sont réalisées avec une ADN polymérase haute fidélité commercialisée par Invitrogen® (Platinum Pfx DNA Polymerase).

25 Les conditions d'amplification sont les suivantes: après une étape initiale de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 5 min, 35 cycles de PCR sont effectués (94°C pendant 15s puis 55°C pendant 30s puis 68°C pendant 3 min), suivi d'une étape finale d'élongation (68°C pendant 7 min) au cours de laquelle 1µl de Taq polymérase classique (GoTaq, Promega®) est rajouté dans le tube de PCR afin d'insérer un résidu de déoxyadénosine aux extrémités 3' des fragments d'amplification (cette étape

est indispensable pour permettre le clonage dans le vecteur pGEM-T utilisé ultérieurement).

Les 3 produits de PCR ainsi obtenus sont clonés dans le vecteur de clonage pGEM-T (commercialisé par la société Promega®) suivant le protocole du fournisseur. Les plasmides obtenus sont nommés pGEM-T/*crtDC*.*XbaI* ; pGEM-T/*crtY* ; pGEM-T/*crtW*

10 3 2^{ième} étape : Construction du plasmide pGEM-T/*crtW* : :*aphA*-

Le gène *aphA*-3 codant une résistance à la kanamycine est libéré du plasmide pUC4K commercialisé par la société Amersham par digestion avec l'enzyme *SalI*. Il est alors inséré dans le plasmide pGEM-T/*crtW* linéarisé par *XhoI*.

15 3^{ième} étape : Construction du plasmide pGEM-T/*crtY* : :*crtW* : : *aphA*-3

La construction précédente contenant les gènes *crtW* et *aphA*-3 est libérée par double digestion *KpnI/EcoRI* puis insérée dans le plasmide pGEM-T/*crtY* linéarisé par le même couple d'enzymes de restriction.

25 4^{ième} étape : Construction du plasmide pGEM-T/*crtDC* : :*crtY* : : *crtW* : : *aphA*-3

La construction précédente contenant les gènes *crtY*, *crtW* et *aphA*-3 est libérée par double digestion *BglII/EcoRI* puis insérée dans le plasmide pGEM-T/*crtDC* linéarisé par le même couple d'enzyme de restriction. La digestion de pGEM-T/*crtDC* par *BglII/EcoRI* entraîne une délétion d'un fragment de 1232 pb correspondant à une partie importante des gènes *crtD* et *crtC*.

5^{ème} étape : Construction du plasmide pJQ200mp18 /crtDC ::crtY :: crtW :: aphA-3

La construction précédente contenant les gènes crtDC, crtY, crtW et aphA-3 est libérée par digestion XbaI puis
5 insérée dans le plasmide suicide pJQ200mp18 linéarisé par XbaI. Le plasmide pJQ200mp18 /crtDC ::crtY :: crtZ ::crtW ::aphA-3 est enfin transféré par électroporation dans la souche conjugative *Escherichia coli* S17.1.

10 6^{ème} étape : Construction d'une souche mutante de *R. palustris* contenant les gènes crtY et crtW de *Bradyrhizobium* ORS278.

Le plasmide précédent pJQ200mp18 /crtDC ::crtY ::crtW :: aphA-3 est délivré dans la souche de *R. palustris* CEA001 par
15 conjugaison avec la souche précédente *E. coli* S17.1 contenant la construction. Les clones conjugants sont sélectionnés sur milieu Hutner contenant de la kanamycine 150µg/ml et de la carbénicilline 50µg/ml. Les clones double recombinants sont sélectionnés après repiquage des clones conjugant sur milieu
20 Hutner contenant du saccharose 5% et de la kanamycine (150µg/ml). Une vérification par PCR est effectuée sur plusieurs clones recombinants afin de s'assurer que les gènes crtY, et crtW ont bien été insérés au niveau des gènes crtD et crtC. Un mutant est retenu pour la suite des expériences : *R.*
25 *palustris* CEA001ΔcrtDC ::crY ::crtW .

B. Analyse des caroténoïdes produit par la souche mutante *R. palustris* CEA001ΔcrtDC ::crY ::crtW - essai dans différentes conditions de culture

30 Afin de déterminer le potentiel de la souche mutante de *R. palustris* CEA001ΔcrtDC ::crY ::crtW à surproduire du β-carotène et de la canthaxanthine, une série d'essais préliminaires a été réalisée dans laquelle différentes conditions de culture ont été testées.

A : Flacon de 120 ml contenant 100 ml de milieu Hutner, 30°C - dégazé pour éliminer toute trace d'oxygène, et placé sous une lampe à incandescence de 100 Watts (conditions lumière, anaérobiose)

5 B : Flacon de 250 ml rempli de 50 ml de milieu Hutner, 30°C - agitation 170 RPM - placé dans une atmosphère où la teneur en oxygène peut être ajustée à 1, 5, 8 % (Conditions lumière, microaérobiose) ou 21% (Conditions lumière, aérobiose)

10 C : Après culture en anaérobiose pendant 2 jours suivant les conditions A, 50 ml sont transférés dans un erlenmeyer à baffles puis mis à agiter 170rpm à l'obscurité pendant une nuit pour fortement oxygéner la culture.

15 Après 3 jours de culture dans les différentes conditions testées, les caroténoïdes produits sont analysés par HPLC. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1 suivant.

Tableau 1 : production de caroténoïdes selon les conditions de culture chez le mutant *R. palustris*

20

CEA001ΔcrtDC ::crY ::crtW

Conditions	DO650	Lycopène mg/L	β-carotène mg/L	Canthaxanthine mg/L
A	3,7	2,7	4,7	0
B 1% O ₂	2,9	0,85	1,13	0,1
B 5% O ₂	2	0,35	0,19	0,32
B 8% O ₂	2,4	0,46	0,16	0,41
B 21% O ₂	1,8	0,12	0,05	0,07
C	3,7	2,4	3,8	0,8

25 Il apparaît clairement que les conditions d'aération et de lumière ont des effets très importants sur la production des caroténoïdes et la croissance de la souche. De fortes quantités de β-carotène peuvent être obtenues en anaérobiose sous lumière (4.7 mg/l), par contre seules de faibles

concentrations de caroténoïdes (lycopène et β -carotène) sont obtenues lorsque la bactérie est cultivée en condition aérobie (21%) en raison de la répression de la synthèse de l'appareil photosynthétique par l'oxygène. La présence d'importantes

5 quantités de β -carotène en conditions lumière, anaérobiose montre bien que le gène *crtY* d'ORS278 qui permet la transformation du lycopène en β -carotène est parfaitement fonctionnel. Par contre, on observe l'absence de production de canthaxanthine dans ces mêmes conditions. Ceci résulte du fait

10 que l'enzyme CrtW qui permet la transformation du β -carotène en canthaxanthine est une oxygénase qui a donc besoin d'oxygène pour fonctionner. En accord avec cette explication, la concentration de canthaxanthine augmente progressivement (de 0,32 à 0,41 mg/l) lorsque la teneur en oxygène passe de 5

15 à 8% avec une baisse concomitante de β -carotène (tableau I). Cette expérience démontre, d'une part la nécessité de la présence d'oxygène pour la formation de canthaxanthine à partir de β -carotène, d'autre part que l'enzyme CrtW d'ORS278 est également fonctionnelle chez ce mutant. La transformation

20 de β -carotène en canthaxanthine en fonction de la teneur en oxygène est aussi démontrée par le chromatogramme présenté sur la figure 4. Un autre argument en faveur d'une transformation du β -carotène en canthaxanthine de façon équimolaire en présence d'oxygène est présenté dans les conditions C, c'est-

25 à-dire en oxygénant la culture après croissance en anaérobiose, où il est possible de transformer une partie de ce β -carotène en canthaxanthine.

Ces premiers essais montrent bien qu'il est possible de produire de la canthaxanthine chez *R. palustris*. Par ailleurs,

30 en jouant sur les conditions d'aération, la quantité de β -carotène transformable en canthaxanthine devrait être proche de 5mg/l soit 6 fois plus que la quantité de canthaxanthine (0,8mg/l) obtenue en culture liquide avec la souche *Bradyrhizobium* ORS278. De plus, le temps de culture a été

divisé par un facteur supérieur à 2 soit une augmentation du même rapport de la productivité.

Exemple 3 : Stratégie de construction d'une souche mutante de *Rhodopseudomonas palustris* produisant de l'astaxanthine

Schéma de construction

La stratégie de construction de cette souche mutante est résumée en figure 3.

Dans cette figure, les légendes des étapes sont les suivantes :

1^{ère} étape : Amplification du gène *crtZ* de *Pseudomonas putida*. Clonage du produit de PCR dans le plasmide p-GEMT (Promega).

2^{ième} étape : Libération par *KpnI* du gène *crtZ*. Insertion dans le site *KpnI* unique du plasmide pGEM-T/*crtY::crtW::apha3*.

3^{ième} étape : Libération des gènes *crtY*, *crtZ*, *crtW* et *apha3* par *BglIII/EcoRI*. Insertion dans le plasmide pGEM-T/*crtDC* linéarisé par les mêmes enzymes.

4^{ième} étape : Libération des gènes *crtDC*, *crtY*, *crtZ*, *crtW* et *apha3* par *XbaI*. Insertion dans le plasmide pJQ200mp18 linéarisé par la même enzyme

Construction

La stratégie générale consiste à insérer le gène *crtZ* de *Pseudomonas putida* dans la souche mutante précédemment construite de *R. palustris* contenant les gènes *crtY* et *crtW* de *Bradyrhizobium* ORS278. L'insertion est faite au niveau du site unique de restriction *KpnI* présent entre les gènes *crtY* et *crtW*.

1^{er} étape : Construction du plasmide pGEM-T/*crtZ*

Le génome de *Pseudomonas putida* a été entièrement séquencé. La séquence du gène *crtZ* est disponible dans les banques de gènes (Genbank ACC : NC_00297). Le gène est

amplifié à partir de l'ADN génomique de *Pseudomonas putida* à l'aide du couple d'amorces :

crtZ.Ps.putida.f :

CCTTTTGGTACCGGAGGACCGTTCCATGCTGTTCAATCTCGCCATATT (SEQ ID N°9)

5 crtZ.Ps.putida.r : GGGGTACCTCACGATTGGCTGCGCCTGCTGCGCAATTG
(SEQ ID N°10)

Les amorces ont été conçues de façon à insérer un site de fixation du ribosome RBS en 5' et un site de restriction *Kpn I* en 5' et en 3' du produit de PCR.

10 L'amplification est réalisée avec une ADN polymérase haute fidélité commercialisée par Invitrogen® (Platinum Pfx DNA Polymerase).

Les conditions d'amplification sont les suivantes: après une étape initiale de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 5
15 min, 35 cycles de PCR sont effectués (94°C pendant 15s, puis 55°C pendant 30s, puis 68°C pendant 1 min), suivi d'une étape finale d'élongation (68°C pendant 7 min) au cours de laquelle 1µl de Taq polymérase classique (GoTaq, Promega®) est rajouté dans le tube de PCR afin d'insérer un résidu de déoxyadénosine
20 aux extrémités 3' des fragments d'amplification (cette étape est indispensable pour permettre le clonage dans le vecteur pGEM-T utilisé ultérieurement).

Le produit de PCR ainsi obtenu est cloné dans le vecteur de clonage pGEM-T suivant le protocole du fournisseur. Le
25 plasmide obtenu est nommé pGEM-T/crtZ.

2^{ème} étape : Construction du plasmide pGEM-T/crtDC : : crtY : : crtZ : : crtW : : aphA-3

La construction précédemment obtenue pGEM-T/crtDC : : crtY : : crtW : : aphA-3 contenant les gènes crtW,
30 crtY de *Bradyrhizobium* ORS278 et le gène de résistance à la kanamycine aphA-3 inséré dans les gènes crtDC de *R. palustris* est linéarisée par l'enzyme *KpnI* dont le site de restriction est situé entre les gènes crtW et crtY. Le gène crtZ cloné

dans le vecteur pGEM-T/*crtZ* est libéré par *KpnI*, puis inséré par ligation dans la construction précédente linéarisée.

3ième étape : Construction du plasmide pJQ200mp18

5 /*crtDC* : :*crtY* : : *crtZ* ::*crtW* : : *aphA-3*

La construction précédente contenant les gènes *crtDC*, *crtY*, *crtZ*, *crtW* et *aphA-3* est libérée par digestion *XbaI* puis insérée par ligation dans le plasmide suicide pJQ200 mp18 linéarisé par *XbaI*. Le plasmide pJQ200mp18
10 /*crtDC* : :*crtY* : :*crtZ* ::*crtW* : :*aphA-3* est transféré par électroporation dans la souche conjugative *Escherichia coli* S17.1.

4ième étape : Construction d'une souche mutante de *R.*
15 *palustris* CEA001 contenant les gènes *crtY* et *crtW* de *Bradyrhizobium* ORS278 et *crtZ* de *Pseudomonas putida*.

Le plasmide précédent pJQ200mp18 /*crtDC* : :*crtY* : :*crtZ* : :*crtW* : : *aphA-3* est délivré dans la souche *R. palustris* CEA001 par conjugaison avec la souche précédente *E. coli* S17.1
20 contenant la construction. Les clones conjugants sont sélectionnés sur milieu Hutner contenant de la kanamycine 150µg/ml et de la carbénicilline 50µg/ml. Les clones double recombinants sont sélectionnés après repiquage des clones conjugants sur milieu Hutner contenant du saccharose 5% et de
25 la kanamycine (150µg/ml). Une vérification par PCR est effectuée sur plusieurs clones recombinants afin de s'assurer que les gènes *crtY*, *crtZ* et *crtW* ont bien été insérés au niveau des gènes *crtD* et *crtC*.

En condition de culture en microaérobiose, la production
30 d'astaxanthine a été constatée chez les bactéries ainsi mutées.

Exemple 4 : Alternative de stratégie de construction d'une souche mutante de *Rhodopseudomonas palustris* produisant de l'astaxanthine.

- 5 Par rapport à la stratégie de construction décrite dans l'exemple 3, le gène *crtZ* indispensable pour produire de l'astaxanthine a été isolé à partir d'une souche d'*Erwinia uredovora* et non *Pseudomonas putida*. La stratégie de construction reste identique à celle décrite dans l'exemple 3
10 à l'exception du couple d'amorces utilisées pour isoler le gène *crtZ* par PCR.

Nouvelles amorces :

crtZ.Er.uredovora.f :

GACGGTACCACCGGAGAAATTATGTTGTGGATTGGAATGCCCTGATC

- 15 *crtZ. crtZ.Er.uredovora.r* : GTCGGTACCTTACTTCCCGGATGCGGGCTCATCCT

Les amorces utilisées ont été également définies de façon à insérer un site de fixation RBS en 5' et un site de restriction KpnI en 5' et en 3' du produit de PCR.

20

- Après construction, la capacité de la souche mutante *R. palustris* CEA001Δ*crtCD* ::*crtY* ::*crtZ* ::*crtW* ::*apha3* à produire de l'astaxanthine a été vérifiée par HPLC après culture sous différentes conditions d'oxygène [Flacon de 250 ml rempli de
25 50 ml de milieu Hutner, 30°C - agitation 170 RPM - placé dans une atmosphère où la teneur en oxygène peut être ajustée à 1, 5, 8 % (Conditions lumière, microaérobiose) ou 21% (Conditions lumière, aérobiose)- Temps de culture 3 jours].

- 30 Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous
Tableau 2 : production de caroténoïdes selon les conditions de culture chez le mutant *R. palustris* CEA001Δ*crtCD* ::*crtY* ::*crtZ* ::*crtW* ::*apha3*

Conditions	DO 650	Lycopène mg/l	B-carotène mg/l	Zéaxanthine mg/l	Astaxanthine mg/l	Canthaxanthine mg/l
1% O ₂	5,24	7,197	1,805	0,633	-	-
5% O ₂	2,57	0,483	0,123	-	0,76	0,19
8% O ₂	1,83	0,133	0,043	-	0,146	0,043
21% O ₂	1,57	0,103	0,103	-	0,032	-

Comme déjà décrit, un effet très important de la teneur en oxygène sur les quantités et les variétés de caroténoïdes produits est constaté. Lorsque la teneur en oxygène est fixée à 5%, le caroténoïde majeur produit est l'astaxanthine. Ces essais montrent ainsi qu'il est possible de surproduire de l'astaxanthine chez *R. palustris*.

REVENDICATIONS

1. Procédé de synthèse de caroténoïdes non photosynthétiques choisis parmi le β -carotène, la canthaxanthine ou l'astaxanthine mettant en œuvre des bactéries photosynthétiques produisant au moins un caroténoïde
5 photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le lycopène, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- i. Délétion, chez les bactéries, d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la
10 voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,
- ii. Insertion des gènes suivants :
 - soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser
15 est le β -carotène,
 - soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le β -carotène,
 - soit le crtY, le crtZ et le crtW si le
20 caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le β -carotène,
- iii. Mise en culture des bactéries ainsi modifiées, et,
- iv. Extraction du ou des caroténoïde(s) contenu(s)
25 dans les bactéries.

2. Procédé selon la revendication 1, de synthèse de canthaxanthine ou d'astaxanthine, caractérisé en ce que les conditions de mise en culture sont séquentielles et comportent les étapes suivantes :

- c. Mise en culture desdites bactéries ainsi
30 modifiées dans un premier temps en anaérobiose sous éclaircment,

d. Puis, dans un second temps en aérobiose en obscurité.

3. Procédé selon la revendication 1 de synthèse de β -carotène, caractérisé en ce que les conditions de mise en culture sont les suivantes :

b. Mise en culture desdites bactéries ainsi modifiées en anaérobiose sous éclaircment.

4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les étapes a et/ou b sont réalisées en conditions de microaérobiose sous éclaircment.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'en conditions de microaérobiose, le pourcentage de dioxygène est compris entre 1 et 10%, de préférence, 3 à 8%, bornes incluses.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que l'on réitère les étapes a et b successivement.

7. Procédé de synthèse de caroténoïdes choisis parmi le β -carotène, la canthaxanthine ou l'astaxanthine, mettant en œuvre des bactéries photosynthétiques produisant au moins un caroténoïde photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le lycopène, caractérisé en ce que le procédé comporte les étapes suivantes :

i. Mise en œuvre de mutants de bactéries photosynthétiques dont la photosynthèse n'est plus réprimée par le dioxygène,

ii. Délétion, chez les bactéries, d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,

iii. Insertion des gènes suivants :

- soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser est le β -carotène,

- soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le β -carotène,
 - soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le β -carotène,
- iv. Mise en culture desdites bactéries ainsi modifiées en aérobiose ou microaérobiose afin de synthétiser de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine ou mise en culture en condition d'anaérobiose afin de synthétiser du β -carotène, et,
- v. Extraction du ou des caroténoïde(s) contenu(s) dans les bactéries.
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les mutants dont la photosynthèse n'est plus réprimée par le dioxygène sont obtenus par délétion du gène codant pour le facteur de transcription PpsR.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les bactéries sont du genre *Rhodopseudomonas*, de préférence de l'espèce, *Rhodopseudomonas palustris*.
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1-8, caractérisé en ce que les bactéries photosynthétiques produisant au moins un caroténoïde photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le lycopène sont obtenues à partir de bactéries photosynthétiques produisant au moins un caroténoïde photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le phytoène, le phytofluène, le ζ -carotène ou le neurosporène, lesdites bactéries ayant subi éventuellement une délétion ou disruption du gène crtI endogène, suivie d'une insertion d'un gène crtI exogène codant pour une phytoène désaturase assurant 4 étapes successives de désaturation du phytoène.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'insertion des gènes crtY, crtZ et/ou crtW est réalisée dans la zone des gènes au moins partiellement délétés.

5 12. Bactérie photosynthétique produisant, de manière alternative ou concomitante, au moins du lycopène, du β -carotène et de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine, caractérisée en ce que ladite bactérie est susceptible d'être obtenue par le procédé selon la revendication 1 ou la
10 revendication 9 dans son rattachement à la revendication 1.

13. Bactérie photosynthétique caractérisée en ce qu'elle est obtenue selon le procédé suivant :

i. Mise en œuvre d'une bactérie photosynthétique synthétisant au moins un caroténoïde
15 photosynthétique dont l'intermédiaire de synthèse est le lycopène,

ii. Délétion d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à
20 arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,

iii. Insertion des gènes suivants :
- soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser est le β -carotène,
- soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à
25 synthétiser est la canthaxanthine ou le β -carotène,
- soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le β -carotène.

30 14. Mutant de bactérie photosynthétique caractérisé en ce qu'il est obtenu selon le procédé suivant :

i. Mise en œuvre d'un mutant de bactérie photosynthétique synthétisant au moins un caroténoïde photosynthétique dont

l'intermédiaire de synthèse est le lycopène, dont la photosynthèse n'est plus réprimée par le dioxygène, produisant de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine,

5 ii. Délétion d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,

 iii. Insertion des gènes suivants :

10 - soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser est le β -carotène,

 - soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le β -carotène,

15 - soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le β -carotène.

15. Bactérie selon les revendications 12 ou 13, ou mutant selon la revendication 14, caractérisé en, ce qu'il est
20 respectivement obtenu à partir de bactérie ou de mutant produisant au moins un caroténoïde photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le phytoène, le phytofluène, le ζ -carotène ou le neurosporène, lesdits bactérie ou mutant ayant subi éventuellement une délétion ou disruption
25 du gène crtI endogène, suivie d'une insertion d'un gène crtI exogène codant pour une phytoène désaturase assurant 4 étapes successives de désaturation du phytoène.

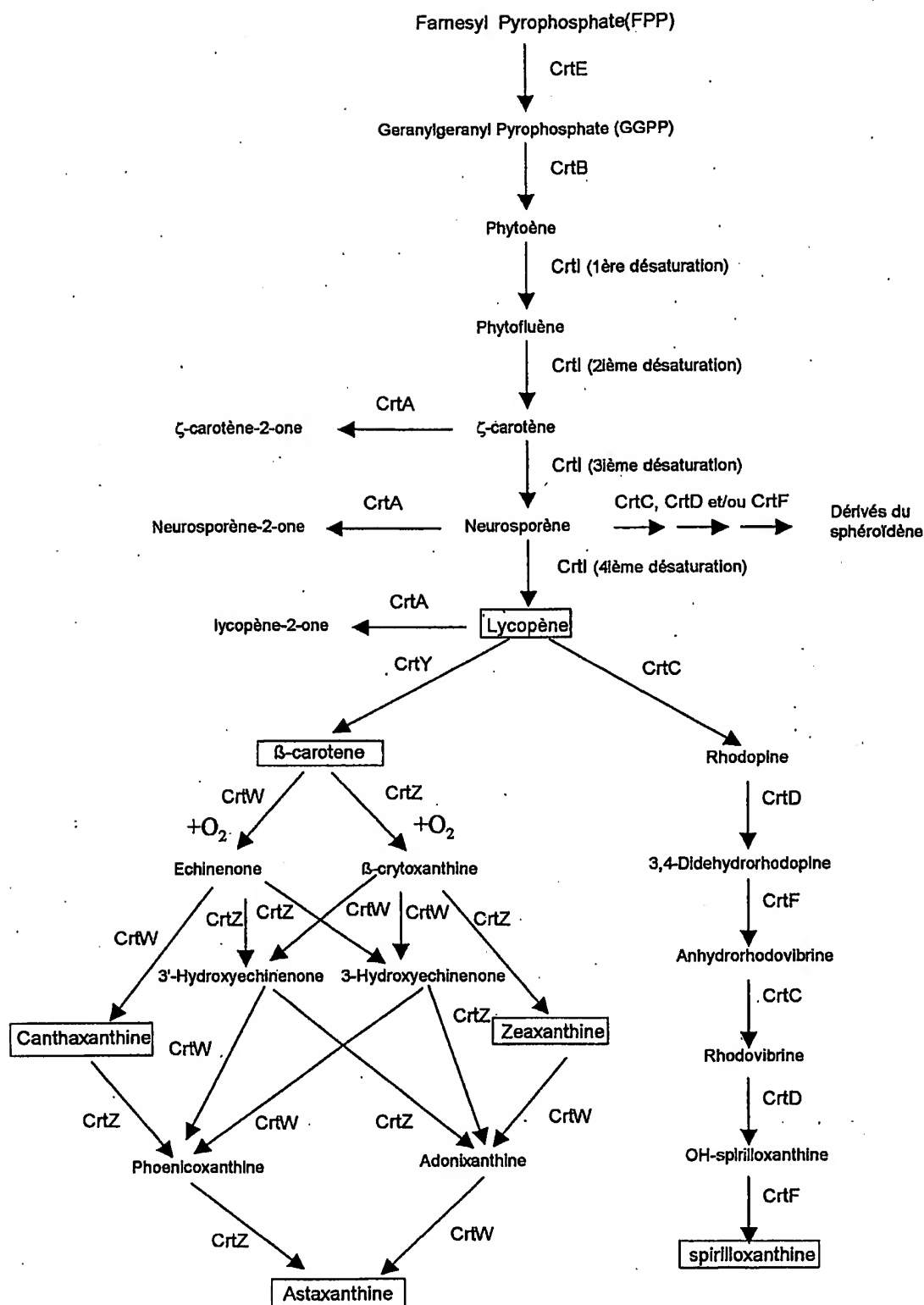
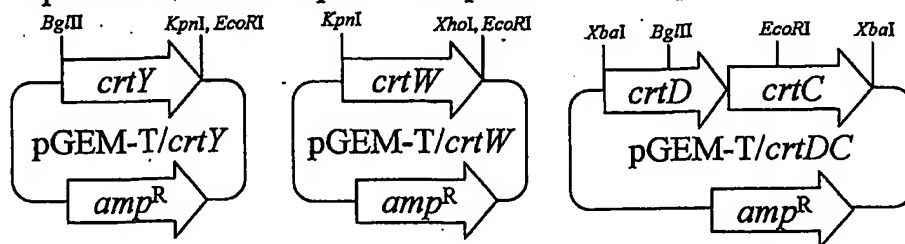


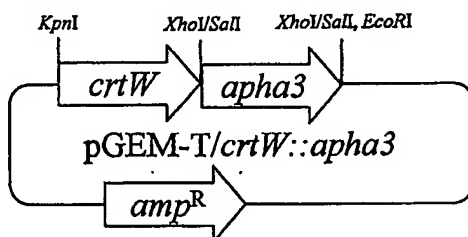
Figure 1

Construction du plasmide pJQ200mp18/*crtDC::crtY::crtW::apha3*

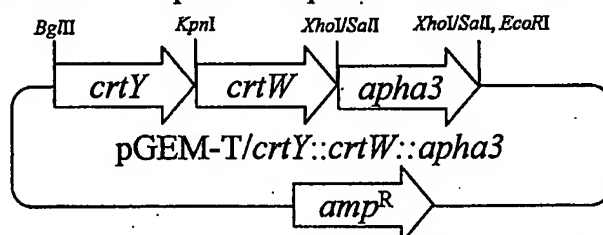
1er étape construction des plasmides pGEM-T/*crtY*, pGEM-T/*crtW*, pGEM-T/*crtDC*



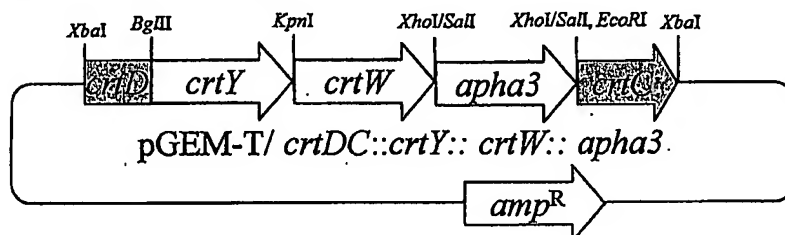
2ième étape construction du pGEM-T/*crtW::apha3*



3ième étape construction du plasmide pGEM-T/*crtY::crtW::apha3*



4ième étape construction du plasmide pGEM-T/*crtDC::crtY::crtW::apha3*



5ième étape construction du pJQ200mp18/*crtDC::crtY::crtW::apha3*

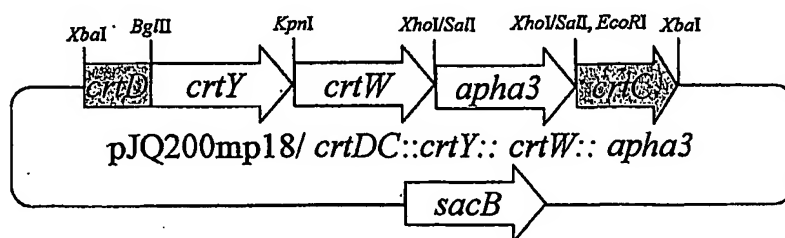
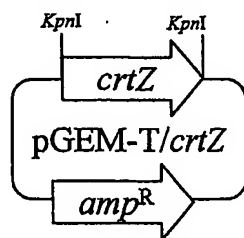


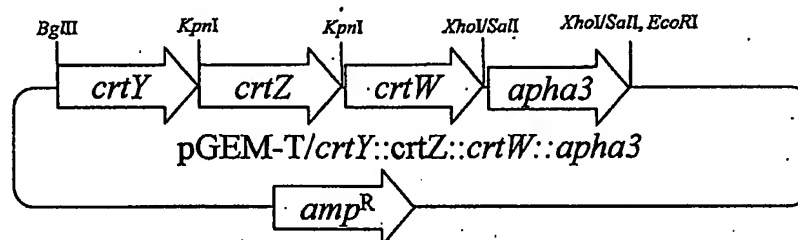
Figure 2

Construction du plasmide pJQ200mp18/*crtDC::crtY::crtZ::crtW::apha3*

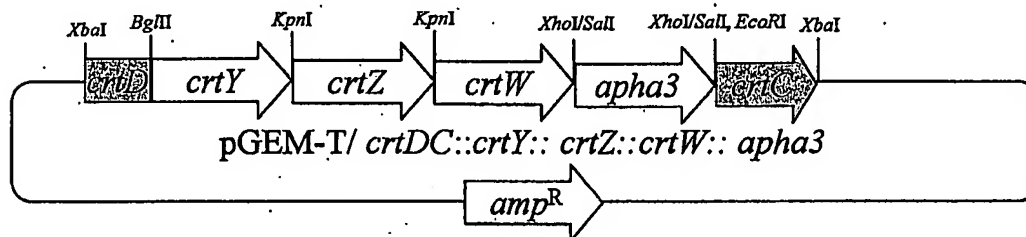
1er étape construction du plasmide pGEM-T/*crtZ*



2ième étape construction du plasmide pGEM-T/*crtY::crtZ::crtW::apha3*



3ième étape construction du plasmide pGEM-T/*crtDC::crtY::crtZ::crtW::apha3*



4ième étape construction du pJQ200mp18/*crtDC::crtY::crtZ::crtW::apha3*

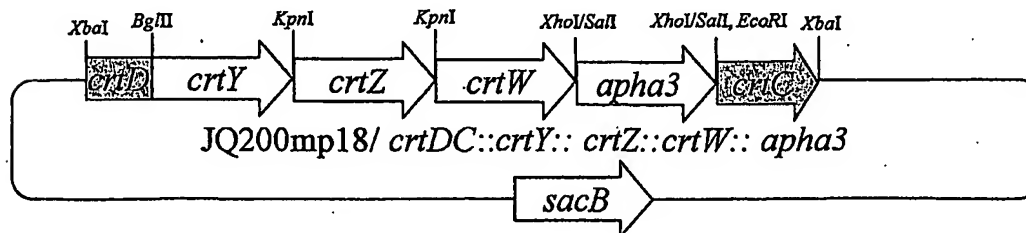


Figure 3

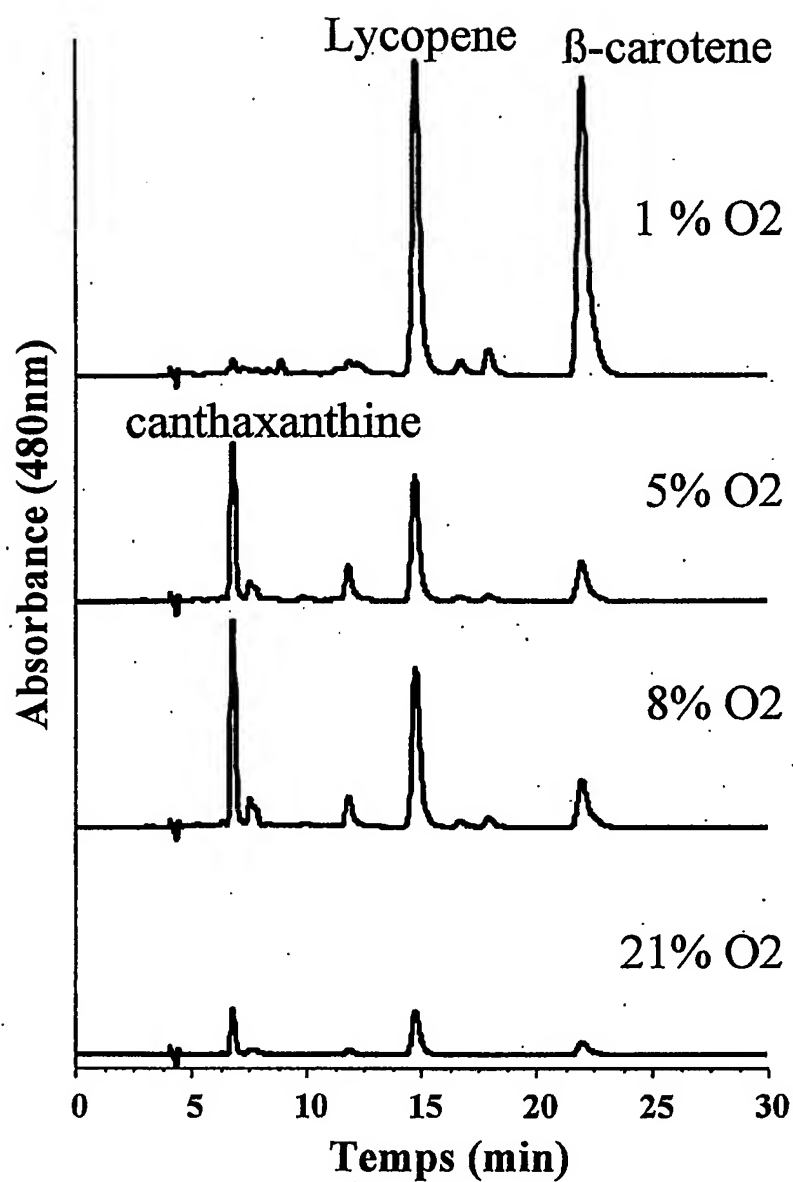


Figure 4

Untitled.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (IRD)
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE (CEA)

<120> Procédé de production de caroténoïdes et bactéries mises en oeuvre

<130> CP/BT 61127 PCT

<150> FR 04 00 191

<151> 2004-01-09

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 35

<212> DNA

<213> primer

<400> 1
gagctcgagt tcgccggcat cggcctgaac ttctc

35

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> primer

<400> 2
ctgctcgaga ggagtattac ggactgatcg aac

33

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> primer

Untitled.ST25

<400> 3
gagtctagat tcgccggcat cggcctgaac ttctc

35

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> primer

<400> 4
ctgtctagaa ggagtattac ggactgatcg aac

33

<210> 5

<211> 48

<212> DNA

<213> primer

<400> 5
tgagatctgg aggctgtcgt catgagtcga gatgccgacg tcatcgtc

48

<210> 6

<211> 45

<212> DNA

<213> primer

<400> 6
gttgaattcc tggtagctca tggggtcttg aaggcgctcg cctca

45

<210> 7

<211> 46

<212> DNA

<213> primer

<400> 7
cggtaccggg agctttgcc aatgatgcag caaccgcca ggctac

46

<210> 8

<211> 41

<212> DNA

Untitled.ST25

<213> primer

<400> 8

gtgaattcca tgctcgagcg ggtttagtca cgcctttcca g

41

<210> 9

<211> 48

<212> DNA

<213> primer

<400> 9

ccttttggtta ccggaggacc gttccatgct gttcaatctc gccatatt

48

<210> 10

<211> 38

<212> DNA

<213> primer

<400> 10

gggggtacctc acgattggct gcgcctgctg cgcaattg

38

<210> 11

<211> 48

<212> DNA

<213> primer

<400> 11

gacggtacca ccggagaaat tatgttggtg atttggaaat ccctgatc

48

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> primer

<400> 12

gtcggtagct tacttcccgg atgcgggctc atcct

35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/000049

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/74 C12R1/01

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12P C12N C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	ARMSTRONG G A: "GENETICS OF EUBACTERIAL CAROTENOID BIOSYNTHESIS: A COLORFUL TALE" ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY, ANNUAL REVIEWS INC., vol. 51, 1997, pages 629-659, XP001097791 PALO ALTO, CA, US ISSN: 0066-4227 abstract page 652, paragraph 2	1-15
X	WO 02/079395 A (DE SOUZA MERVYN L ; KOLLMANN SHERRY R (US); SCHROEDER WILLIAM A (US);) 10 October 2002 (2002-10-10) examples 5,6; table 7 ----- -/--	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex

* Special categories of cited documents

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 June 2005

Date of mailing of the international search report

12/07/2005

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Jenn, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/000049

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	<p>GARCIA-ASUA GUILLERMO ET AL: "Functional assembly of the foreign carotenoid lycopene into the photosynthetic apparatus of Rhodobacter sphaeroides, achieved by replacement of the native 3-step phytoene desaturase with its 4-step counterpart from Erwinia herbicola"</p> <p>MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 44, no. 1, April 2002 (2002-04), pages 233-244, XP002290898 ISSN: 0950-382X abstract; figure 1; table 1 page 234, right-hand column, paragraph 2 - page 237, right-hand column, paragraph 1</p> <p>-----</p>	1-15
A	<p>EP 1 072 683 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 31 January 2001 (2001-01-31) paragraphs '0093!', '0133!', '0134!</p> <p>-----</p>	1-15
A	<p>MISAWA N ET AL: "STRUCTURE AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF A MARINE BACTERIAL CAROTENOID BIOSYNTHESIS GENE CLUSTER AND ASTAXANTHIN BIOSYNTHETIC PATHWAY PROPOSED AT THE GENE LEVEL"</p> <p>JOURNAL OF BACTERIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 177, no. 22, 1 November 1995 (1995-11-01), pages 6575-6584, XP000196417 ISSN: 0021-9193 the whole document</p> <p>-----</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2005/000049

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02079395	A	10-10-2002	CA 2436366 A1	10-10-2002
			EP 1377598 A2	07-01-2004
			JP 2004528839 T	24-09-2004
			NO 20033353 A	25-09-2003
			WO 02079395 A2	10-10-2002
			US 2005003474 A1	06-01-2005
<hr/>				
EP 1072683	A	31-01-2001	AU 3169999 A	01-11-1999
			CA 2325798 A1	21-10-1999
			EP 1072683 A1	31-01-2001
			US 6806076 B1	19-10-2004
			CN 1305529 A	25-07-2001
			WO 9953071 A1	21-10-1999
			JP 2000300256 A	31-10-2000
			JP 2000300257 A	31-10-2000
			US 2005032169 A1	10-02-2005
<hr/>				

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR2005/000049

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/74 C12R1/01

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12P C12N C12R

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	ARMSTRONG G A: "GENETICS OF EUBACTERIAL CAROTENOID BIOSYNTHESIS: A COLORFUL TALE" ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY, ANNUAL REVIEWS INC., vol. 51, 1997, pages 629-659, XP001097791 PALO ALTO, CA, US ISSN: 0066-4227 abrégé page 652, alinéa 2	1-15
X	WO 02/079395 A (DE SOUZA MERVYN L ; KOLLMANN SHERRY R (US); SCHROEDER WILLIAM A (US);) 10 octobre 2002 (2002-10-10) exemples 5,6; tableau 7 ----- -/--	1-15

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 juin 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

12/07/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P B 5816 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Jenn, T

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2005/000049

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no des revendications visées
A	<p>GARCIA-ASUA GUILLERMO ET AL: "Functional assembly of the foreign carotenoid lycopene into the photosynthetic apparatus of Rhodobacter sphaeroides, achieved by replacement of the native 3-step phytoene desaturase with its 4-step counterpart from Erwinia herbicola"</p> <p>MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 44, no. 1, avril 2002 (2002-04), pages 233-244, XP002290898 ISSN: 0950-382X abrégé; figure 1; tableau 1 page 234, colonne de droite, alinéa 2 - page 237, colonne de droite, alinéa 1 -----</p>	1-15
A	<p>EP 1 072 683 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 31 janvier 2001 (2001-01-31) alinéas '0093!', '0133!', '0134! -----</p>	1-15
A	<p>MISAWA N ET AL: "STRUCTURE AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF A MARINE BACTERIAL CAROTENOID BIOSYNTHESIS GENE CLUSTER AND ASTAXANTHIN BIOSYNTHETIC PATHWAY PROPOSED AT THE GENE LEVEL"</p> <p>JOURNAL OF BACTERIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 177, no. 22, 1 novembre 1995 (1995-11-01), pages 6575-6584, XP000196417 ISSN: 0021-9193 le document en entier -----</p>	1-15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR2005/000049

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 02079395	A	10-10-2002	CA 2436366 A1	10-10-2002
			EP 1377598 A2	07-01-2004
			JP 2004528839 T	24-09-2004
			NO 20033353 A	25-09-2003
			WO 02079395 A2	10-10-2002
			US 2005003474 A1	06-01-2005
<hr/>				
EP 1072683	A	31-01-2001	AU 3169999 A	01-11-1999
			CA 2325798 A1	21-10-1999
			EP 1072683 A1	31-01-2001
			US 6806076 B1	19-10-2004
			CN 1305529 A	25-07-2001
			WO 9953071 A1	21-10-1999
			JP 2000300256 A	31-10-2000
			JP 2000300257 A	31-10-2000
US 2005032169 A1	10-02-2005			
<hr/>				